

肺転移性腫瘍モデルに対するIL-12の効果とそのエフェクター細胞の同定

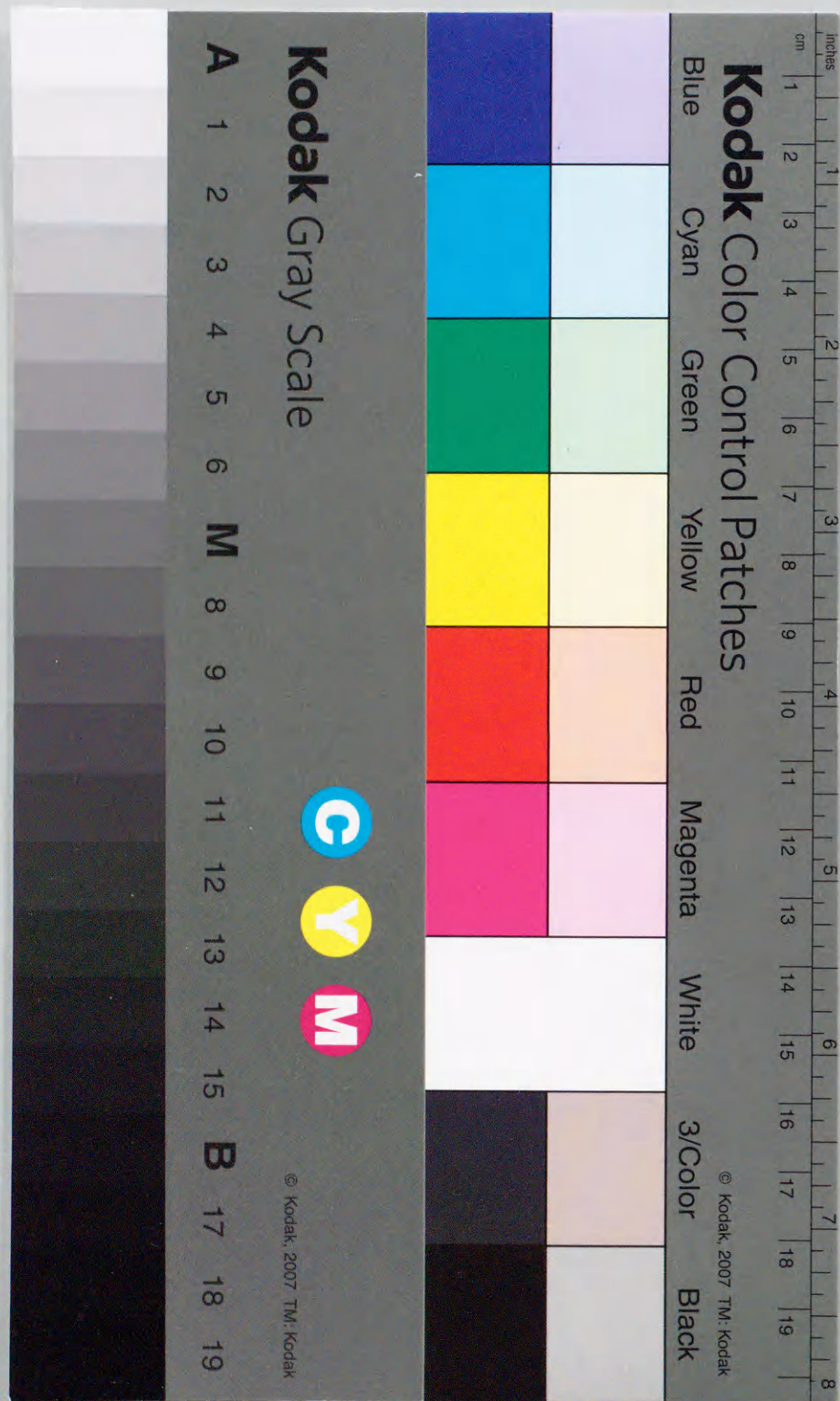
著者	橋元 亘
学位授与機関	Tohoku University
URL	http://hdl.handle.net/10097/54019

博士論文

肺転移性腫瘍モデルに対するIL-12の効果と
そのエフェクター細胞の同定

橋元 亘

平成8年度提出
東北大学



原 著

肺転移性腫瘍モデルに対する IL-12 の効果と
そのエフェクター細胞の同定

橋 元 亘

東北大学歯学部口腔外科学第二講座

(指導: 手島貞一名誉教授)

(指導: 熊谷勝男名誉教授)

(兼担主任: 鹿沼晶夫教授)

(平成 8 年 9 月 26 日受付, 平成 8 年 11 月 11 日受理)

Effect of IL-12 on pulmonary metastases in tumor models
and identification of effector cells involved

Wataru Hashimoto

Department of Oral and Maxillofacial Surgery II

Tohoku University School of Dentistry

(Director: Emeritus Prof. Teiiti Teshima)

(Director: Emeritus Prof. Katsuo Kumagai)

(Chief: Prof. Akio Kanuma)

Abstract: We studied the effects of cytokines on tumor metastases in murine models and found that systemic administration of IL-12 substantially reduced hepatic metastases of various tumor cells via activated NK1⁺ $\alpha\beta$ TCR^{int} cells in the liver. In the present study, we examined the role of IL-12 in inhibiting pulmonary metastases of tumors, which is a critical factor in the prognosis of patients with malignant tumors in the oral cavity. Metastatic tumor cells were inoculated intravenously or subcutaneously in euthymic and athymic murine models of pulmonary metastases. In vivo administration of IL-12 inhibited pulmonary metastases in both metastatic models. Moreover, cytotoxic NK1⁺ $\alpha\beta$ TCR^{int} cells against tumor cells were obtained from the lung of euthymic and athymic mice after IL-12 administration. These findings indicate that IL-12-stimulated lung NK1⁺ $\alpha\beta$ TCR^{int} cells, including extrathymic ones, may be the effective against pulmonary metastases similar to hepatic NK1⁺ $\alpha\beta$ TCR^{int} cells in models of liver metastases. We also examined the role of IL-12 in a metastatic model of squamous cell carcinoma (SCC), which is the most common malignant tumor arising in the oral cavity. Systemic administration of IL-12 also inhibited the metastases and growth of SCC. In conclusion, IL-12 may be useful in cancer treatment.

Key words: IL-12, NK1⁺ $\alpha\beta$ TCR^{int} cells, pulmonary metastases, malignant tumors in oral cavity

緒 言

口腔領域の悪性腫瘍は、口腔内という肉眼的に確認

しやすい場所に発生することより、比較的早期発見が可能であると思われる。また近年、再建手術法の進歩により、悪性腫瘍を広範に切除することが可能となり、

原発巣の制御率は飛躍的に向上している。従って口腔領域の悪性腫瘍の予後を規定する要因としては転移が非常に大きな問題となっている。しかし転移の中でも所属リンパ節転移については、近年の画像診断の著しい進歩に加え、腫瘍の組織化学的性状からその転移を予測する試みも為されるようになり、早期診断が可能になってきたこと、また治療の面でも、頸部郭清術という確立した治療法により、転移腫瘍の制御が可能であることなどから、患者の予後を規定する最大の要因は遠隔転移であると言える。そして、口腔領域の悪性腫瘍における遠隔転移が最も多く認められる臓器は肺であることより¹⁻⁴⁾、この肺転移の制御が口腔領域の悪性腫瘍を治療する上で重要な課題となっている。

当学部口腔細菌学教室では、以前よりマウスの転移モデルを用いて、悪性腫瘍の転移形成のメカニズムと、サイトカインが転移形成に与える影響について解析してきた^{5,6)}。この過程で筆者を含むグループは、マウス実験腫瘍における Interleukin12 (IL-12) の著明な転移抑制効果を見だし、報告してきた⁷⁾。

IL-12 はヒトの B リンパ芽球様細胞の培養液中に、細胞傷害性リンパ球成熟因子または Natural killer (NK) 細胞刺激因子として Kobayashi ら⁸⁾ および Gate 1 y ら⁹⁾ により別々に精製分離された物質であり、1991 年にはその cDNA が¹⁰⁾、そして 1992 年には、マウスホモログの cDNA が¹¹⁾ 単離されている。IL-12 は、上記の B リンパ芽球様細胞を産生細胞として見いだされたのであるが、生体では実際には大食細胞や樹状細胞などのアクセサリ細胞が主として産生しているものと考えられている^{12,13)}。その機能としては NK 細胞や活性化 T 細胞のキラー活性の増強およびインターフェロン- γ (IFN- γ)、腫瘍壊死因子 (TNF) の産生誘導などが報告されており、特に Th1 型の CD4 陽性細胞の増殖を選択的に誘導することより、Th1/Th2 を制御する因子として注目されている^{12,13)}。特に Brunda らは¹⁴⁾、皮下接種したマウスの悪性腫瘍の増殖や実験的転移に対して IL-12 が強い抑制作用を有することを報告しているが、そのエフェクター細胞については明らかにしていない。

筆者らのグループは、種々の細菌成分の接種により、マウス肝臓のリンパ球に腫瘍細胞に対する強い細胞傷害活性が誘導されること、この細胞は、NK 細胞の抗原性を有するが NK 細胞ではなく、NK 抗原の他に T 細胞レセプター (CD3/TCR) も発現している NK1.1+ $\alpha\beta$ TCR^{int} T 細胞であること、そしてこの細胞の活性

化は、細菌成分によって誘導される IL-12 の刺激に基づくものであることなどを明らかにした¹⁵⁾。さらに筆者らは、これらの成績に基づいて、マウスに IL-12 の投与を行ったところ、肝転移性腫瘍の転移形成が著しく抑制されること、そしてその主たるエフェクター細胞は、この NK1.1+ $\alpha\beta$ TCR^{int} T 細胞であることが明らかにになった⁷⁾。

以上のような背景の下に筆者は、IL-12 が肝以外の臓器、特に肺への転移にも抑制効果を示すか否かを、マウスの実験的肺転移モデルを用いて検討した。さらにその際に働くエフェクター細胞について解析を行い、NK1.1+ $\alpha\beta$ TCR^{int} T 細胞はいずれの臓器の転移でも、IL-12 による抑制の主役を占めていることを明らかにした。

さらに筆者は、マウス扁平上皮癌細胞を用いた頭頸部腫瘍転移モデルでの抗腫瘍効果についても解析し、IL-12 の臨床応用の可能性についても検討を加えたので、併せて報告する。

材料と方法

1. 実験動物

C3H/HeN+/+, C57BL/6+/+, C57BL/6 bg/bg, BALB/c+/+, BALB/c nu/nu, 6-8 週齢の雄性マウスを日本クレアより購入した。また、C57BL/6 nu/nu 6-8 週齢の雄性マウスを新潟大学医学部医動物免疫学講座の安保教授より供与を受けた。

マウスは、東北大学医学部附属動物実験施設にて、specific pathogenfree (SPF) 環境下で飼育し使用した。

2. 腫瘍細胞

肝転移系腫瘍細胞としては、C57BL/6 マウス由来の T 細胞腫である EL4 細胞を、肺転移系腫瘍細胞としては、BALB/c マウス由来の結腸癌細胞である Colon26 細胞、C57BL/6 マウス由来の Melanoma である B16 細胞、同じく C57BL/6 マウス由来の肺癌細胞である 3LL-SA 細胞、C3H/HeN 由来の扁平上皮癌細胞である NR-S1 細胞を用いた。

3. サイトカイン

実験に使用したリコンビナント・マウス IL-12 (mIL-12)^{10,11)} は、Genetics 研究所 (Andover, MA) の小林路子博士より供与された。その比活性は 4.9×

10⁶ U/mg で、エンドトキシン量は 1.2 EU/mg 以下である。

4. 腫瘍転移実験

各種腫瘍細胞を 1×10⁵ 個/ml となるように phosphate buffered saline, pH 7.4 (PBS) で調整し、マウスあたり 0.2 ml (2×10⁴ 個/mouse) を尾静脈より接種した。m IL-12 は腫瘍接種翌日から 5 日後まで 1 日 1 回計 5 回、0.5 μ g ずつ腹腔内に投与した。また、対照群には PBS (0.2 ml) を同様のスケジュールで投与した。腫瘍細胞接種後 14 日目にマウスをエーテル麻酔下で脱血死させ肺を摘出し、両群マウス肺の肉眼的転移結節数を計測することにより IL-12 投与の効果を評価した。

5. 細胞調整

マウスを犠牲死させた後、肝臓、肺、脾臓、胸腺の各臓器を摘出した。肝臓はあらかじめ、PBS の門脈注入によって灌流洗浄を行い血液を除去後に摘出した。摘出肝をハサミで細切後、200 ゲージのステンレスメッシュですりつぶし 10% FCS 添加 RPMI 1640 培地 (日水製薬株式会社) にて 1,800 r.p.m., 10 分間、4°C の条件で 2 度洗浄した。次いで同培地で 30% に調整した Percoll 液 (Pharmacia Biotech 株式会社) に細胞を再浮遊させ 2,000 r.p.m., 15 分間、室温で遠心して、肝単核球を肝実質から分離した。これを、Lysing Buffer (0.75% 塩化アンモニウム, 0.21% トリス液 pH 7.65) にて洗浄して赤血球を除去したものを肝単核球浮遊液として用いた¹⁶⁾。脾臓はハサミで細切後、200 ゲージのステンレスメッシュですりつぶし、1,500 r.p.m., 5 分間遠心後、ペレットに Lysing Buffer を加えて、赤血球を除いたものを脾単核球浮遊液として用いた。胸腺は摘出したものを、200 ゲージのステンレスメッシュですりつぶし、10% Fetal Calf Serum (FCS) RPMI 1640 培地にて 1,500 r.p.m., 5 分間遠心により洗浄して用いた。肺の単核球は肝臓の単核球の採取法に準じて調整した。

6. 細胞傷害試験

標的細胞として用意したナチュラルキラー (NK) 抵抗性のマウスリンパ球系細胞株 P815 細胞 2×10⁶ 個を Na² ⁵¹Cr O₄ 液 (1 mCi/ml) 0.2 ml に浮遊させ、37°C で 1 時間炭酸ガス培養器にて培養の後 10% FCS 加 RPMI 1640 培地で 2 回洗浄して標的細胞として用

いた。対照群と、IL-12 で刺激したマウスの肝臓、脾臓、肺などの単核球細胞を 4 段階に希釈してマイクロプレートに 100 μ l ずつ各 well に加えた後、ラベルした標的細胞液を 100 μ l ずつ混入し 4 時間の ⁵¹Cr 遊離法にて傷害活性を測定した。

また、% specific lysis は、次式で算出した。

$$\% \text{ specific lysis} = \frac{(\text{Experimental release} - \text{spontaneous release})}{(\text{Maximum release} - \text{spontaneous release})} \times 100$$

7. 免疫蛍光染色

細胞表面抗原の同定はモノクローナル抗体を用いた二重染色法により行った。使用した抗体は、Fluorescein isothiocyanate (FITC) で標識した抗マウス $\alpha\beta$ TCR モノクローナル抗体と Phycoerythrin (PE) で標識した NK1.1 モノクローナル抗体 (Pharmingen Co. San Diego, CA) であり、蛍光染色細胞は FACS-can (Becton Dickinson & Co. Ltd, Mountain View, CA) にて解析した。

8. 抗体補体処理

抗体補体処理後の細胞傷害活性は、肝臓と肺のリンパ球を、各モノクローナル抗体と補体 (LOW-TOX-M) とで以下の方法で、*in vitro* で処理した後に測定した。まず、0.5~1.0×10⁷ 個のリンパ球を 45 分 4°C で至適濃度の抗体と反応させ、次いで RPMI 1640 培養液で遠心洗浄し、これを、45 分 37°C で補体反応させ遠心洗浄を 3 回行い各分画に分離した。分離したリンパ球は 95% 以上の純度があることを FACSscan で確認した。

用いたモノクローナル抗体は抗 CD3 抗体 (Pharmingen Co. San Diego, CA)、抗 CD8 抗体 (Pharmingen Co. San Diego, CA)、抗 NK-1.1 抗体 (Pharmingen Co. San Diego, CA) である。

9. IL-12 の投与による、マウス扁平上皮癌細胞の増殖ならびに転移形成の抑制実験

C3H/HeN マウスの扁平上皮癌に由来する NRS-1 細胞 2×10⁶ 個を同系マウスの頭頸部皮下に接種した。

mIL-12 は腫瘍接種 1 日後から週 2 回、0.5 μ g ずつ、移植腫瘍の近傍に皮下投与した。また対照群には PBS (0.2 ml) を同様の場所に、同様のスケジュールで投与

した。腫瘍増殖は腫瘍接種後、週に2回腫瘍塊の大きさを測定し、 $\text{tumor volume (mm}^3\text{)} = (\text{腫瘍塊長径}) \times (\text{腫瘍塊短径})^2$ として判定した。また転移は、腫瘍細胞接種後28日目にマウスをエーテル麻酔下で脱血死させ肺を摘出し、肺の肉眼的転移結節数を計測することにより評価した。

10. 統計的処理

細胞傷害試験、転移抑制実験における、各群間の有意差の検定は、student t-test により行い、 $p\text{-value} < 0.05$ をもって有意差ありとした。

結 果

1. 各種マウス腫瘍肺転移モデルにおける IL-12 投与による転移抑制

各種マウス腫瘍の肺転移モデルを用いて、IL-12 の抗転移効果について検討した。各々の肺転移性腫瘍の腫瘍細胞 2×10^4 個を尾静脈より接種し、接種翌日から5日後まで IL-12 を $0.5 \mu\text{g}$ ずつ腹腔内投与し、14日後に肺を摘出して転移結節数を対照群と比較した。その結果、正常マウスへの接種腫瘍に対して著明な転移抑制効果を示すのみならず、T細胞欠損のヌードマウスや、NK活性欠如のベージュマウスにおいても同様(86~98%)の、著しい転移抑制効果が認められた(表1)。これは、我々がすでに報告している肝転移系腫瘍を用いた場合の抗転移効果と同様であった⁷⁾。

表1 各種マウスにおける IL-12 の転移抑制効果

マウス	腫瘍細胞	転移臓器	転移結節数		転移抑制率 (%)
			対照群 (n=5)	IL-12 投与群 (n=5)	
BALB/c	+/+	Colon 26	125±25	10±10	92
C57BL/6	+/+	EL4	171±16	24±5	86
		B16	61±26	2±1	96
		3LL-SA	151±13	14±5	91
BALB/c	nu/nu	Colon 26	58±11	1±1	98
C57BL/6	nu/nu	B16	75±10	4±1	94
C57BL/6	bg/bg	B16	64±5	2±1	97

各転移性腫瘍を尾静脈より 2×10^4 個静脈内接種し、その後1~5日後まで IL-12 を $0.5 \mu\text{g}$ ずつ腹腔内投与し、14日後の転移結節数をコントロール群と比べて示した。肝転移、肺転移の両転移系において、正常マウス・ヌードマウス・ベージュマウスのすべてで、著明な転移抑制効果が得られた。全ての群で、 $p < 0.005$ であった。

2. IL-12 投与による腫瘍細胞に対する細胞傷害活性の増強

次に、IL-12 投与マウスの各臓器からリンパ球を分離し、NK抵抗性の腫瘍細胞である P815 を標的細胞とする細胞傷害活性を測定した。その結果、図1に示すごとく、通常のNK活性測定に用いる脾細胞では、IL-12 投与による増強は認められたが、その程度は極めて弱いものであった。また、リンパ節では IL-12 投与により著明な変化は見られなかった(成績省略)。これに反して、前報⁷⁾に示したように、肝には著しい細胞傷害活性の増強がみられ、肺でも、それに準ずる強い細胞傷害活性の増強が認められた(図1a)。この IL-12 による細胞傷害活性の増強は、T細胞欠損ヌード(nu/nu)マウスでもほとんど同様に認められた(図1b)。

3. 抗体と補体の処理による細胞傷害活性の抑制

細胞傷害活性を示す細胞の性質を明らかにすべく、IL-12 投与マウスの肺と肝臓から分離したリンパ球を *in vitro* で、NK細胞抗原である NK1.1 に対する抗体と補体とで処理した後に、P815 を標的細胞とする細胞傷害活性を測定した。同時に T細胞抗原 CD3 と CD8 に対する抗体と補体でも処理して、細胞傷害活性への影響を検討した(表2)。

その結果、肺と肝臓のリンパ球の両方において、抗 NK1.1 抗体と補体とで処理した群は、ほとんど完全にその細胞傷害活性が失活した。ところが、抗 CD3 抗体と補体とで処理した群においてもほぼ同様の細胞傷害活性の失活が認められた。これに反して、抗 CD8 抗

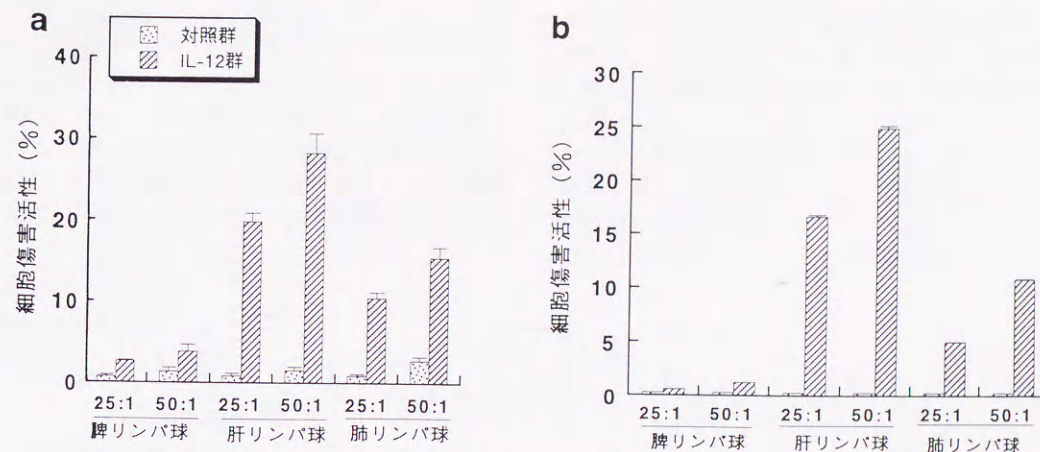


図1 C57BL/6 正常マウス (a) と C57BL/6 ヌードマウス (b) における、脾臓、肝臓および肺のリンパ球の細胞傷害活性。IL-12 $0.5 \mu\text{g}$ 腹腔内投与群と PBS 0.2 ml 投与群 (各々 $n=5$) の24時間後の脾臓と肝臓と肺のリンパ球の細胞傷害活性を、P815 を標的細胞として4時間の⁵¹Cr遊離法にて調べた。エフェクター細胞と標的細胞との比率は50:1, 25:1で行った。対照群とIL-12投与群とを比較すると、肝臓と肺では $p < 0.005$ 、脾臓では $p < 0.05$ であった。

表2 IL-12 により肝と肺に誘導されるエフェクター細胞の解析

単核球の処理方法	細胞傷害活性 (%)			
	肝単核球		肺単核球	
	50:1	25:1	50:1	25:1
未処理	31.2±1.7	15.3±0.5	20.5±0.7	10.3±1.5
補体	30.4±1.2	14.8±1.8	19.7±1.3	12.4±0.3
Anti-NK1.1+補体	2±0.3	0	2.6±0.4	<1
Anti-CD3+補体	5±0.5	<1	3.1±0.9	1.2±0.1
Anti-CD8+補体	29.7±0.1	15.7±0.8	18.8±1.0	9.8±0.9

IL-12 による刺激された肝臓と肺のリンパ球を各種抗体と補体とでネガティブセレクションした後に、P815 を標的細胞として細胞傷害活性を調べた。エフェクター細胞と標的細胞との比率は50:1, 25:1で行った。肝と肺の両方で NK1⁺CD3⁺細胞による強い細胞傷害活性が示された。

体と補体とで処理した群では細胞傷害活性の低下はほとんど見られなかった(表2)。同様の結果は T細胞欠損ヌードマウスでも得られた(成績省略)。

4. IL-12 の投与による NK1.1⁺ $\alpha\beta\text{TCR}^{\text{int}}$ 細胞の変化

以上のことから、正常マウスばかりでなく T細胞欠損のヌードマウスにも存在し、脾臓より肝臓や肺に、より濃厚に分布している、CD8⁺キラーT細胞以外のエ

フェクター細胞が、IL-12 の悪性腫瘍に対する抗転移効果を担っている可能性が示唆された。そこで、C57BL/6 マウスにおける、各臓器(リンパ節、脾臓、肝臓および肺)のリンパ球について、NK細胞マーカーである NK1.1 と T細胞抗原に対するモノクローナル抗体を用いた二重染色法により、その発現パターンを FACSscan にて解析した。

その結果、コントロールマウスでは、すでに報告したように^{7,15)}肝臓において NK 抗原(NK1.1)陽性の他

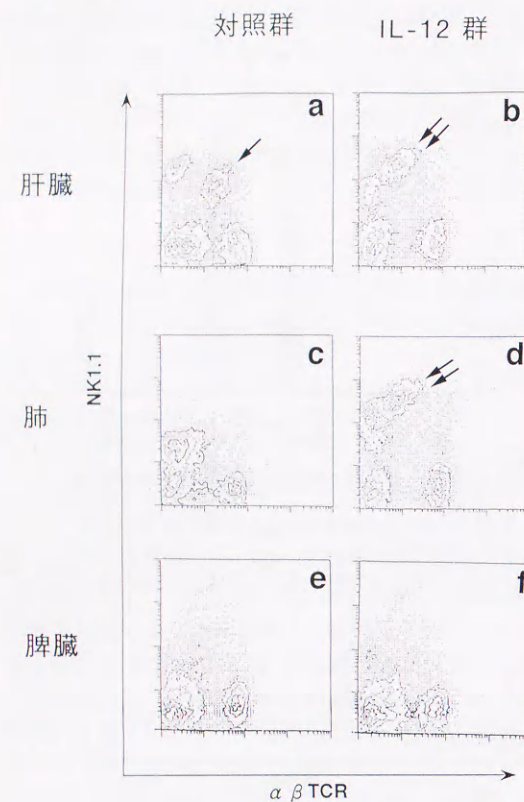


図2 C57BL/6正常マウスにおける、IL-12投与による肝臓、肺および脾臓でのリンパ球の表面抗原の変化
IL-12 0.5 μ g 腹腔内投与後24時間の肝臓、肺および脾臓のリンパ球の $\alpha\beta$ TCR (FITC) とNK1.1 (PE) の二重染色のパターン。
(↓)はNK1.1⁺ $\alpha\beta$ TCR^{int}細胞、(↓↓)は活性化されたNK1.1⁺ $\alpha\beta$ TCR^{int}細胞。

に、T細胞レセプター陽性 (intermediate) の細胞群 (NK1.1⁺ $\alpha\beta$ TCR^{int}細胞と略称) が認められた (図2a ↓)。IL-12投与マウスでは、これまで報告してきたように^{7,15)}、肝リンパ球のNK1.1⁺ $\alpha\beta$ TCR^{int}細胞のNK1.1抗原の発現が増強され、そのNK1の発現強度がNK細胞のそれと同等かまたはそれ以上になることが確認された (図2b ↓↓)。

一方、肺のリンパ球では、コントロールマウスではNK1.1⁺ $\alpha\beta$ TCR^{int}細胞がほとんどみられないが (図2c)、IL-12投与マウスでは肝臓と同様にNK1.1⁺ $\alpha\beta$ TCR^{int}細胞が認められた (図2d ↓↓)。また、脾臓 (図2e, f) および胸腺やリンパ節のリンパ球では、ほと

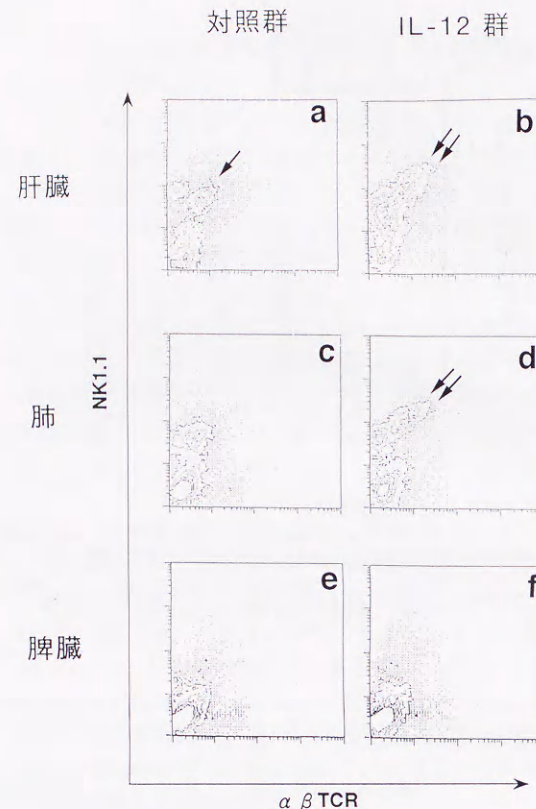


図3 C57BL/6ヌードマウスにおける、IL-12投与による肝臓、肺および脾臓でのリンパ球の表面抗原の変化
IL-12 0.5 μ g 腹腔内投与後24時間の肝臓、肺および脾臓のリンパ球の $\alpha\beta$ TCR (FITC) とNK1.1 (PE) の二重染色のパターン。
(↓)はNK1.1⁺ $\alpha\beta$ TCR^{int}細胞、(↓↓)は活性化されたNK1.1⁺ $\alpha\beta$ TCR^{int}細胞。

んど変化がみられなかった (成績省略)。次に胸腺を欠くヌードマウスについて検討した。コントロールマウスでは検討したすべての臓器で、胸腺由来T細胞であるNK1.1⁺ $\alpha\beta$ TCR⁺細胞は認められなかったが、肝臓において、胸腺外分化T細胞と言われているNK1.1⁺ $\alpha\beta$ TCR^{int}細胞が認められた (図3a ↓)。そしてIL-12を投与したヌードマウスでも、正常マウスの場合と同様に肝臓と肺のリンパ球で、NK1の発現強度が増強されたNK1.1⁺ $\alpha\beta$ TCR^{int}細胞が認められた (図3b ↓↓, 図3d ↓↓)。

5. マウス扁平上皮癌に対するIL-12の抗腫瘍効果

以上より、IL-12により肝臓だけでなく肺においてもNK1.1⁺ $\alpha\beta$ TCR^{int}細胞が誘導され、実験的転移に対し強い抑制作用を示すことが示唆された。そこで、口腔領域の悪性腫瘍で最も発現頻度が高い、扁平上皮癌のモデルとして、皮下接種した扁平上皮癌細胞に対す

るIL-12の増殖抑制作用と抗転移作用を検討するため、マウス由来の扁平上皮癌であるNR-S1細胞¹⁷⁾を用いて、腫瘍増殖抑制実験および転移抑制実験を行った。

まず、NR-S1細胞 2×10^6 個をC3H/HeNマウスの頭頸部皮下に接種し、IL-12による抗腫瘍効果を、腫瘍増殖曲線により検討した。

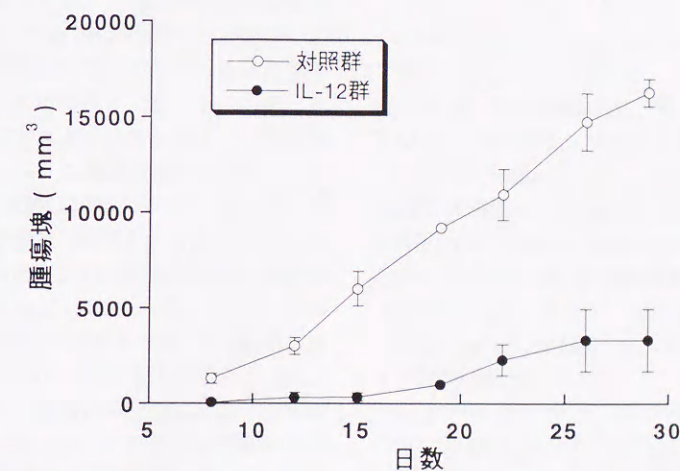


図4 マウス扁平上皮癌細胞 (NR-S1) の皮下増殖に対するIL-12の抑制効果
NR-S1細胞 2×10^6 個を頭頸部皮下に接種した後、IL-12を週2回、0.5 μ gずつ腹腔内投与し、腫瘍の増殖を測定した。グラフは、IL-12投与群、対照群共に5匹ずつのデータをmean \pm S.D.にて示した。また、 $p < 0.005$ であった。

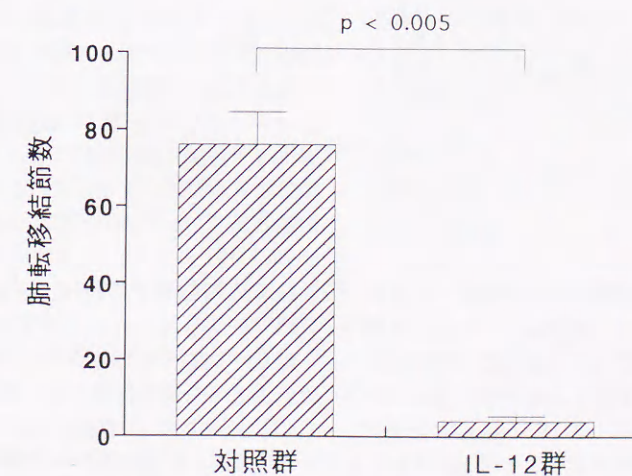


図5 マウス扁平上皮癌細胞 (NR-S1) 皮下接種による肺転移に対する、IL-12の抑制効果
NR-S1細胞 2×10^6 個を頭頸部皮下に接種して30日後の、肺への転移の有無を、対照群とIL-12投与群とで比較した。グラフは、IL-12投与群、対照群共に5匹ずつのデータをmean \pm S.D.にて示した。

対照群 (n=5) では腫瘍の増殖が見られるものの、IL-12 を 0.5 μ g, 週 2 回腹腔内投与した群 (n=5) では腫瘍増殖抑制効果が認められた (図 4)。また、30 日目にマウスを犠牲死させ、NR-S1 細胞の肺への転移の有無を確認したところ、PBS を投与した対照群の肉眼的肺転移結節数が 76 ± 8.5 (mean \pm S.D.) であるのに対して、mIL-12 投与群では 4 ± 1.4 (mean \pm S.D.) と転移の抑制効果が認められた (図 5)。

考 察

1989 年に Kobayashi らは、T 細胞や NK 細胞を活性化し IFN- γ 産生を誘導するサイトカイン、NKSF (Natural killer cell stimulatory factor) を発見した⁸⁾。また、1990 年に Gately らは IL-2 と相乗的に細胞傷害性リンパ球を活性化する CLMF (cytotoxic lymphocyte maturation factor) を見いだした⁹⁾。その後 1991 年に cDNA がクローニングされ、NKSF と CLMF が同一物質であることが確認され、Interleukin 12 (IL-12) と命名された¹⁰⁾。この IL-12 の生物活性としては、(1) NK 細胞^{18,19)} や活性化 T 細胞²⁰⁾ などの細胞傷害性細胞の活性化、(2) 活性化 T 細胞などの増殖促進作用^{21,22)}、(3) Th1 タイプ CD4 陽性細胞からの IFN- γ 、TNF- α などのサイトカイン産生の誘導、(4) ナイーブ T 細胞から Th1 タイプ CD4 陽性細胞への分化促進などが報告されている²³⁾。また、Brunda らは、皮下接種したマウスの腫瘍細胞の増殖や実験的転移に対して IL-12 が強い抑制作用を有すること、この効果は、T 細胞欠損のヌードマウスなどで著明に低下することから、作用の主体は T 細胞、特に CD8⁺ CTL であろうと推察している¹⁴⁾。

一方、我々のグループは IL-12 により肝臓の NK1.1⁺ $\alpha\beta$ TCR^{int} 細胞が活性化され、強い細胞傷害活性を示すことを報告している⁷⁾。この NK1.1⁺ $\alpha\beta$ TCR^{int} 細胞は、肝臓や胸腺^{24,25)}、骨髄²⁶⁾、脾臓^{26,27)} など生体内臓器に広く存在することが報告されてきた。本細胞群はヌードマウスや胸腺摘出マウスの各臓器にも殆ど同率に見られることより胸腺外で分化した原始的 T 細胞に属する細胞と考えられ²⁷⁻³⁰⁾、これらの細胞は、胸腺上皮細胞ではなく MHC class Ib 分子またはその関連分子を持つ骨髄細胞によって選択されていると報告されている³¹⁻³³⁾。このように、NK1.1⁺ $\alpha\beta$ TCR^{int} 細胞は通常の成熟 T 細胞とは異なった特徴を有し、その機能としては、移植骨髄細胞の拒絶³⁴⁾ や

自己免疫疾患の抑制³⁵⁾ などが報告されている。

本論文で筆者は、mIL-12 投与により肝臓と同様に肺においても、強い細胞傷害活性を有する NK1.1⁺ $\alpha\beta$ TCR^{int} 細胞が誘導され、悪性腫瘍に対する抗転移効果を示すことを見いだした。

無刺激の肺のリンパ球について調べると、NK1.1⁺ $\alpha\beta$ TCR^{int} 細胞はほとんどみられないが (図 2c)、IL-12 の投与によって NK1.1⁺ $\alpha\beta$ TCR^{int} 細胞が著明に増加することが認められた (図 2d ↓)。

この NK1.1⁺ $\alpha\beta$ TCR^{int} 細胞の由来は現在のところ不明であるが、次の 2 つの可能性が考えられる。1 つは、肺に元来存在するわずかの NK1.1⁺ $\alpha\beta$ TCR^{int} 細胞が IL-12 によって増殖した可能性である。しかし、IL-12 投与後の細胞増殖について *in vitro* で検討したところ、肝臓のリンパ球では増殖がみられるのに対し、肺のリンパ球ではほとんど細胞増殖がみられない (成績省略) ことより、その可能性は非常に少ないものと考えられる。2 つめは、IL-12 の投与によって活性化された細胞が、肝臓や骨髄から流れてきた可能性である。IL-12 の投与後に各臓器で NK1.1⁺ $\alpha\beta$ TCR^{int} 細胞を調べたところ、経時的に肝臓、肝静脈、末梢血にこの細胞が見出される³⁶⁾ ことから、この可能性が強いのではないかと考えられる。Gately ら³⁷⁾ は、IL-12 によって肺と肝臓に細胞傷害活性を有するリンパ球が誘導されること、また Nastala ら³⁸⁾ は腫瘍細胞の静注による肺転移を IL-12 が抑制することを報告している。さらに彼らは、この細胞傷害活性の増強と抗腫瘍効果は IL-12 による IFN- γ の産生と CD8⁺ のキラー細胞の誘導によるものであると述べている。

しかし我々の実験系では、IL-12 の投与は、T 細胞欠損のヌードマウスや NK 活性の欠如が報告されているページマウスにおいても、全く同様に転移抑制効果を示した (表 1) こと、さらに、抗体補体処理実験等の結果より、NK1.1⁺ $\alpha\beta$ TCR^{int} 細胞が IL-12 の転移抑制効果を担っていることが明らかになったことなどから、その細胞傷害活性は、MHC 非拘束性の、CD8⁺ CTL 以外のエフェクター細胞、すなわち NK1.1⁺ $\alpha\beta$ TCR^{int} 細胞によるものであることが考えられた。

このような実験結果の違いは、用いた実験システムの違いによってもたらされるのではないかと考えられる。つまり、皮下接種された腫瘍の拒絶には、CD8⁺ T 細胞がより重要な役割を果たすが、静脈内接種により転移臓器に定着した腫瘍細胞の初期防御には、NK1.1⁺ $\alpha\beta$ TCR^{int} 細胞や NK 細胞が主要なエフェクターとし

て働いており、この過程では、これらの細胞の産生する IFN- γ などのサイトカインが、その補助分子として働いているものと思われる。

口腔領域の悪性腫瘍の中で扁平上皮癌は最も発生頻度が高く、また遠隔転移症例においては肺転移の頻度が高いことが報告されている¹⁻⁴⁾。そこで、口腔癌のモデルとして、マウスの扁平上皮癌細胞を頭頸部皮下に移植する系で mIL-12 の効果を検討したところ、腫瘍の増殖と肺転移の形成に対して、著明な抑制効果が認められた。このことは、口腔領域の扁平上皮癌を含めた悪性腫瘍の治療に、IL-12 を臨床応用できる可能性を示唆するものである。

これまで筆者はマウスにおける、IL-12 により誘導される、細胞傷害性 NK1.1⁺ $\alpha\beta$ TCR^{int} 細胞について述べてきたが、ヒトの場合の IL-12 のエフェクター細胞についても検討してみた。マウスの NK1.1⁺ $\alpha\beta$ TCR^{int} 細胞に相当するヒトの細胞分画としては、T 細胞のマーカーである CD3 と NK マーカーである CD56 の両抗原を発現している CD3⁺ CD56⁺ 細胞が考えられる。

この細胞は、ヒト末梢血から得られたリンパ球を IL-2、IFN- γ 、IL-1 および CD3 抗体による刺激下で培養することにより誘導され、強い細胞傷害活性を示すことが報告されている³⁹⁾。また我々は、ヒト末梢血から得られたリンパ球を IL-12 刺激下で培養し活性化することにより、効率良く CD3⁺ CD56⁺ 細胞が誘導され強い細胞傷害活性を示すことを見いだしている⁴⁰⁾。

このことから、ヒトにおいても、マウスの NK1.1⁺ $\alpha\beta$ TCR^{int} 細胞に相当する CD3⁺ CD56⁺ 細胞が IL-12 によって活性化されてエフェクター細胞となり、強い抗転移効果を発揮することが考えられる。

従って、IL-12 のヒト生体内における役割がさらに詳細に検討され、臨床応用に際しての副作用等の問題点が克服されれば、IL-12 の投与あるいは産生細胞の

内容要旨: 筆者らはこれまで、マウスの転移モデルを用いて、悪性腫瘍の転移形成に対するサイトカインの影響について解析してきた。

この過程で、細胞性免疫を増強するサイトカインと言われている Interleukin12 (IL-12) が、悪性腫瘍の肝転移を強く抑制すること、またその効果を担っている細胞が肝臓にある NK1.1⁺ $\alpha\beta$ TCR^{int} T 細胞であることを明らかにした。

一方、口腔外科領域の悪性腫瘍の遠隔転移の頻度は肺において最も高く、そのことが予後を悪くしている。そこで筆者は、IL-12 の肺転移への抑制効果を、マウスの実験的肺転移モデルを用いて検討した。その結果、IL-12 は肺転移においても肝転移と同様に強い抑制効果を示すことがわかった。また、その際に働くエフェクター細胞は肝の場合と同様、NK1.1⁺ $\alpha\beta$ TCR^{int} T 細胞であることも明らかになった。そ

略 語 表

IL-12: Interleukin-12
NK1.1 ⁺ $\alpha\beta$ TCR ^{int} : NK1.1 positive, $\alpha\beta$ TCR intermediate intensity
NK1.1 ⁻ $\alpha\beta$ TCR ⁺ : NK1.1 negative, $\alpha\beta$ TCR
FACS: fluorescence activated cell sorter
FITC: Fluorescein isothiocyanate
IFN- γ : Interferon- γ
IL-1: Interleukin-1
IL-2: Interleukin-2
PE: Phycoerythrin
TNF- α : Tumor necrosis factor- α
CTL: cytotoxic T lymphocyte
Th1: type1 helper T cell
Th2: type2 helper T cell

謝 辞

稿を終えるにあたり、始終御懇篤な御指導と、御校閲を賜りました本学口腔外科学第二講座 鹿沼晶夫教授ならびに口腔解剖学第二講座 加賀山学教授、歯科薬理学講座 篠田 壽教授、口腔外科学第一講座 茂木克俊教授、元口腔細菌学恩師 熊谷勝男名誉教授、元口腔外科学第二講座恩師 手島貞一名誉教授、順天堂大学免疫学講座 竹田和由博士に深甚なる謝意を表します。また本研究を遂行するにあたり終始御教示御指導および御協力いただきました本学口腔外科学第二講座および口腔細菌学講座教員各位にあわせて厚く感謝いたします。また、本論文は文部省科学研究費補助金 (特別研究員奨励費) による研究成果の一部です。

して、ヌードマウスを用いた解析により、この NK1.1⁺ $\alpha\beta$ TCR^{int} T 細胞は、通常の成熟 T 細胞とは異なる細胞である可能性が示唆された。

さらに筆者は、口腔領域にみられる悪性腫瘍のうち最も発生頻度が高い扁平上皮癌のモデルとして、マウス扁平上皮癌の頭頸部皮下移植の転移モデルを用いて、IL-12 の抗腫瘍効果について検討した。その結果、IL-12 は皮下接種腫瘍の増殖および転移の双方において著明な抑制効果を示した。このことより、IL-12 の臨床応用への可能性が示唆された。

文 献

- Probert, J.C., Thompson, R.W. and Bagshaw, M.A.: Patterns of spread of distant metastases in head and neck cancer. *Cancer* **33**: 127-133, 1974.
- Papac, R.J.: Distant metastases from head and neck cancer. *Cancer* **53**: 342-345, 1984.
- Kotwell, C., Sato, K., Razack, M.S., Rao, U., Bakamjian, V. and Shedd D.P.: Metastatic pattern in squamous cell cancer of the head and neck. *Am. J. Surg.* **154**: 439-442, 1987.
- 長田哲次, 大関 悟, 笹栗正明, 光石正子, 田代英雄: 顎口腔腫瘍の肺転移例についての検討. *日口外誌* **36**: 2166-2173, 1990.
- Tsuchiya, Y., Igarashi, M., Suzuki, R. and Kumagai, K.: Production of colony stimulating factor by tumor cells and the factor mediated induction of suppressor cells. *J. Immunol.* **141**: 699-709, 1988.
- Takeda, K., Hatakeyama, K., Tsuchiya, Y., Rikiishi, H. and Kumagai, K.: A correlation between GM-CSF gene expression and metastases in murine tumors. *Int. J. Cancer* **47**: 413-420, 1991.
- Hashimoto, W., Takeda, K., Anzai, R., Ogasawara, K., Sakihara, H., Sugiura, K., Seki, S. and Kumagai, K.: Cytotoxic NK1.1⁺ Ag $\alpha\beta$ T cells with intermediate TCR induced in the liver of mice by IL-12. *J. Immunol.* **154**: 4333-4340, 1995.
- Kobayashi, M., Fitz, L., Ryan, M., Hewick, R.M., Clark, S.C., Chan, S., Loudon, R., Sherman, F., Perussia, B. and Trinchieri, G.: Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J. Exp. Med.* **170**: 827-845, 1989.
- Gately, M.K., Desai, B.B., Wolitzky, A.G., Quinn, P.M., Dwyer, C.M., Podlaski, F.J., Familletti, P.C., Sinigaglia, F., Chizzonite, R., Gubler, U. and Stern, A.S.: Regulation of lymphocyte proliferation by a heterodimeric cytokine, IL-12 (cytotoxic lymphocyte maturation factor). *J. Immunol.* **147**: 874-882, 1991.
- Wolf, S.F., Temple, P.A., Kobayashi, M., Young, D., Dicig, M., Lowe, L., Dzialo, R., Fitz, L., Ferenz, C., Hewick, R.M., Kelleher, K., Herrmann, S.H., Clark, S.C., Azzoni, L., Chan, S.H., Trinchieri, G. and Perussia, B.: Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. *J. Immunol.* **146**: 3074-, 1991.
- Schoenhaut, D.S., Chua, A.O., Wolitzky, A.G., Quinn, P.M., Dwyer, C.M., McComas, W., Familletti, P.C., Gately, M.K. and Gubler, U.: Cloning and expression of murine IL-12. *J. Immunol.* **148**: 3433-3440, 1992.
- Brunda, M.J.: Interleukin 12. *J. Leuk. Biol.* **55**: 280-288, 1994.
- Banks, R.E., Patel, P.M., and Selby, P.J.: Interleukin 12: a new clinical played in cytokine therapy. *Brit. J. Cancer* **71**: 656-659, 1995.
- Brunda, M.J., Luistro, L., Warriar, R.R., Wright, R.B., Hubbard, B.R., Murphy, M., Wolf, S.F. and Gately, M.K.: Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors. *J. Exp. Med.* **178**: 1223-1230, 1993.
- 杉浦慶太郎: Porphyromonas gingivalis, E. coli および LPS による新しいリンパ球群の誘導. *東北大学歯学雑誌* **13**: 37-50, 1994.
- Goossens, P.L., Jouin, H., Marchal, G. and Milon, G.: Isolation and flow cytometric analysis of the free lymphomyeloid cells present in murine liver. *J. Immunol. Methods* **132**: 137-144, 1990.
- 竹田和由: マウス可移植性腫瘍における肺転移と GM-CSF 産生能との相関. *東北大学歯学雑誌* **9**: 83-94, 1990.
- Robertson, M.J., Soiffer, R.J., Wolf, S.F., Manley, T.J., Donahue, C., Young, D., Herrmann, S.H. and Ritz, J.: Response of human natural killer (NK) cells to NK cell stimulatory factor (NKSF): Cytolytic activity and proliferation of NK cells are differentially regulated by NKSF. *J. Exp. Med.* **175**: 779-788, 1992.
- Chehimi, J., Valiante, N.M., D'Andrea, A., Rengaraju, M., Rosado, Z., Kobayashi, M., Perussia, B., Wolf, S.F., Starr, S.E. and Trinchieri, G.: Enhancing effect of natural killer cell stimulatory factor (NKSF/interleukin-12) on cell-mediated cytotoxicity against tumor-derived and virus infected cells. *Eur. J. Immunol.* **23**: 1826-1830, 1993.
- Mehrotra, P., Wu, D., Crim, J.A., Mostowski, H.S. and Siegel, J.P.: Effects of IL-12 on the generation of cytotoxic activity in human CD8⁺ T lymphocytes. *J. Immunol.* **151**: 2444-2452, 1993.
- Perussia, B., Chan, S.H., D'Andrea, A., Tsuji, K., Santoli, D., Pospisil, M., Young, D., Wolf, S.F. and Trinchieri, G.: Natural killer (NK) cell stimulatory factor or IL-12 has differential effects on the proliferation of TCR-alpha beta⁺, TCR-gamma delta⁺ T lymphocytes, and NK cells. *J. Immunol.* **149**: 3495-3502, 1992.
- Kubin, M., Kamoun, M., and Trinchieri, G.: Interleukin 12 synergizes with B7/CD28 interaction in inducing efficient proliferation and cytokine production of human T cells. *J. Exp. Med.* **180**: 211-222, 1994.
- Sypek, J.P., Chung, C.L., Mayor, S.E., Subramanyam, J.M., Goldman, S., J. Sieburth, D.S., Wolf, S.F. and Schaub, R.G.: Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. *J. Exp. Med.* **177**: 1797-1802, 1993.
- Ballas, Z.K. and Rasmussen, W.: NK1.1⁺ thymocytes adult murine CD4⁺, CD8⁺ thymocytes contain an NK1.1⁺, CD3⁺, CD5^{hi}, CD44^{hi}, TCR-Vb8⁺ subset. *J. Immunol.* **145**: 1039-1045, 1990.
- Levitsky, H.I., Golumbek, P.T. and Pardoll, D.: The fate of CD4⁺ 8⁺ T cell receptor- $\alpha\beta$ ⁺ thymocytes. *J. Immunol.* **146**: 1113-1117, 1991.
- Sykes, M.: Unusual T cell populations in adult murine bone marrow prevalence of CD3⁺ CD4⁺ CD8⁺ and $\alpha\beta$ TCR⁺ NK1.1⁺ cells. *J. Immunol.* **145**: 3209-3215, 1990.
- Kikly, K. and Dennert, G.: Evidence for extrathymic development of TNK cells NK1⁺ CD3⁺ cells responsible for acute marrow graft rejection are present in thymus-deficient mice. *J. Immunol.* **149**: 403-412, 1992.
- Seki, S., Abo, T., Ohteki, T., Sugiura, K. and Kumagai, K.: Unusual $\alpha\beta$ -T cells expanded in autoimmune *lpr* mice are probably a counterpart of normal T cells in the liver. *J. Immunol.* **147**: 1214-1221, 1991.
- Ohteki, T., Okuyama, R., Seki, S., Abo, T., Sugiura, K., Kusumi, A., Ohmori, T., Watanabe, H. and Kumagai, K.: Age-dependent increase of extrathymic T cells in the liver and their appearance in the periphery of older mice. *J. Immunol.* **149**: 1562-1570, 1992.
- Abo, T., Kusumi, A., Seki, S., Ohteki, T., Sugiura, K., Masuda, T., Rikiishi, H., Iiai, T. and Kumagai, K.: Activation of extrathymic T cells in the liver and reciprocal inactivation of intrathymic T cells by bacterial stimulation. *Cell. Immunol.* **142**: 125-136, 1992.
- Bendelac, A., Killeen, N., Littman, D.R. and Schwartz, R.H.: A subset of CD4⁺ thymocytes selected by MHC class I molecules. *Science* **263**: 1774-1781, 1994.
- Coles, M.C. and Raulet, D.H.: Class I dependence of the development of CD4⁺ CD8⁺ thymocytes. *J. Exp. Med.* **180**: 395, 1994.
- Ohteki, T. and MacDonald, R.: Major histocompatibility complex class I related molecules control the development of CD4⁺ 8⁺ and CD4⁺ 8⁺ subsets of Natural Killer1.1⁺ T cell receptor- α/β ⁺ cells in the liver of mice. *J. Exp. Med.* **180**: 699-708, 1994.
- Takeda, K. and Dennert, G.: Acute rejection of marrow grafts in mice. Dependence on and independence of functional TCR in the rejection process. *J. Immunol.* **152**: 4407-4415, 1994.

- 35) Takeda, K. and Dennert, G.: The development of autoimmunity in C57/BL6 lpr mice correlates with the disappearance of natural killer type 1-positive cells: Evidence for their suppressive action on bone marrow stem cell proliferation, B cell immunoglobulin secretion, and autoimmune symptoms. *J. Exp. Med.* **177**: 155-163, 1993.
- 36) Takeda, K., Seki, S., Ogasawara, K., Anzai, R., Hashimoto, W., Sugiura, K., Takahashi, M., Satoh, M. and Kumagai, K.: Liver NK1.1⁺ CD4⁺ ab T cells activated by IL-12 as a major effect in inhibition of experimental tumor metastases. *J. Immunol.* **156**: 3366-3373, 1996.
- 37) Gately, M.K., Warrier, R.R., Honasoge, Carvajal, D.M., Faherty, D.A., Connaughton, S.E., Anderson, T.D., Sarmiento, U., Hubbard, B.R. and Murphy, M.: Administration of recombinant IL-12 to normal mice enhances cytolytic lymphocyte activity and induces production of IFN-gamma in vivo. *Intern Immunol.* **153**: 157-167, 1994.
- 38) Nastala, C.L., Edington, H.D., McKinney, T.G., Tahara, H., Nalesnik, M.A., Brunda, M.J., Gately, M.K., Wolf, S.F., Schreiber, R.D. and Storkus, W.J.: Recombinant IL-12 administration induces tumor regression in association with IFN-gamma production. *J. Immunol.* **153**: 1697-1706, 1996.
- 39) Lu, P-H. and Negrin, R.S.: A novel population of expanded human CD3⁺ CD56⁺ cells derived from Tcells with potent in vivo antitumor activity in mice with severe combined immunodeficiency. *J. Immunol.* **153**: 1687-1695, 1994.
- 40) Satoh, M., Seki, S., Hashimoto, W., Ogasawara, K., Kumagai, K., Matsuno, S. and Takeda, K.: Cytotoxic gd or ab T cells with an NK cell marker, CD56, are induced from human peripheral blood lymphocytes in vitro by a combination of IL-12 and IL-2. *J. Immunol., In press.*

